

SÉRIE A, N° 1387

N° D'ORDRE

2252

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

MICHEL VOLKONSKY

2^e THÈSE. — SUR LES CONDITIONS DE CULTURE ET LE POUVOIR DE SYNTHÈSE
DE *Saprolegnia* sp. (Étude qualitative de l'alimentation
carbonée, azotée et sulfurée.)

Soutenues le 16 février 1933 devant la Commission d'Examen.

MM. M. CAULLERY . . .	Président.
P. WINTREBERT . . .	} Examinateurs.
A. GUILLIERMOND . .	

Extrait des *Annales de l'Institut Pasteur*

PARIS

IMPRIMERIE A. MARETHEUX ET L. PACTAT

1, RUE CASSETTE, 1

1933

SÉRIE A, N° 1387

N° D'ORDRE

2252

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

MICHEL VOLKONSKY

2^e THÈSE. — SUR LES CONDITIONS DE CULTURE ET LE POUVOIR DE SYNTHÈSE
DE *Saprolegnia* *sp.* (Étude qualitative de l'alimentation
carbonée, azotée et sulfurée.)

Soutenues le 16 février 1933 devant la Commission d'Examen.

MM. M. CAULLERY . . . *Président.*
P. WINTREBERT . . } *Eraminateurs.*
A. GUILLIERMOND . }

Extrait des *Annales de l'Institut Pasteur*

PARIS

IMPRIMERIE A. MARETHEUX ET L. PACTAT

1, RUE CASSETTE, 1

1933

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.

Doyen honoraire . . . M. MOLLIARD.

Professeurs honoraires. { H. LE CHATELIER. EMILE PICARD.
H. LEBESGUE. RÉMY PERRIER.
A. FERNBACH. LÉON BRILLOUIN.
A. LEDUC. A. DEREIMS.

E. GOURSAT	Analyse supérieure et algèbre supérieure.
P. JANET.	Electrotechnique générale.
F. WALLERANT . . .	Minéralogie.
P. PAÏN-LEVÉ. . . .	Mécanique analytique et mécanique céleste.
M. CAULLERY	Zoologie (Evolution des êtres organisés).
EMILE BOREL.	Calcul des probabilités et Physique mathém.
H. ABRAHAM.	Physique.
M. MOLLIARD	Physiologie végétale.
E. CARTAN.	Géométrie supérieure.
GABRIEL BERTRAND.	Chimie biologique.
JEAN PERRIN.	Chimie physique.
L. LAPICQUE.	Physiologie générale.
M ^{me} P. CURIE	Physique générale et radioactivité.
G. URBAIN.	Chimie générale.
L. MARCHIS	Aviation.
E. VESSIOT.	Théorie des fonctions et théorie des transformations.
A. COTTON.	Physique générale.
J. DRACH.	Application de l'analyse à la géométrie.
CHARLES FABRY. . . .	Physique.
R. LESPIEAU.	Théories chimiques.
P. PORTIER	Physiologie comparée.
CHARLES PEREZ. . . .	Zoologie.
BLAISE	Chimie organique.
<i>Professeurs</i>	P.-A. DANGEARD. . . . Botanique.
	LÉON BERTRAND. . . . Géologie structurale et géologie appliquée.
	E. RABAUD. Biologie expérimentale.
	G. JULIA Calcul différentiel et calcul intégral.
	PAUL MONTEL. Mécanique rationnelle.
	V. AUGER Chimie appliquée.
	P. WINTREBERT. . . . Anatomie et histologie comparées.
	O. DUBOSQ Biologie maritime.
	EUGÈNE BLOCH Physique théorique et physique céleste.
	N. Etude des combustibles.
	L. LUTAUD. Géographie physique et géographie dynam.
	HENRI VILLAT. . . . Mécanique des fluides et applications.
	CH. JACOB Géologie.
	P. PASCAL Chimie minérale.
	E. ESCLANGON. . . . Astronomie.
	H. B. NARD. Mécanique expérimentale des fluides.
	C. MAUGUIN Minéralogie.
	L. BLARINGHEM. . . . Botanique.
	A. GUILLIERMOND. . . Botanique (P. C. N.).
	A. DENJOY Mathématiques générales.
	A. DUFOUR. Physique (P. C. N.).
	H. BEGHIN. Mécanique physique et expérimentale.
	DE BROGLIE. Théories physiques.
E. PECHARD.	Chimie (Enst P. C. N.).
A. GUILLET	Physique.
M. GUICHARD.	Chimie minérale.
A. MICHEL-L VY . . .	Pétrographie.
H. MOUTON	Chimie physique.
L. DUNOYER.	Optique appliquée.
M. JAVILLIER.	Chimie biologique.
ROBERT-L VY.	Zoologie.
A. DEBIERNE	Radioactivité.
E. DARMOIS.	Physique.
G. BRUHAT	Physique.
F. PICARD.	Zoologie (Evolution des êtres organisés).
L. JOLEAUD.	Paléontologie.
M. FRECHET.	Calcul des Probabilités et Physiques mathématiques.
M ^{me} RAMART-LUCAS. . .	Chimie organique.
FOCH	Mécanique expérimentale des fluides.
PAUTHENIER	Physique (P. C. N.).
VILLEY	Mécanique physique et expérimentale.
LABROUSTE.	Physique du Globe.
FREUNDLER.	Chimie (P. C. N.).
PRENANT	Zoologie.
P. JOB.	Chimie générale.
CHRÉTIEN.	Optique appliquée.
BOHN	Zoologie (P. C. N.).
COMBES.	Sciences naturelles (P. C. N.).
GARNIER	Mécanique rationnelle.
PERES.	Mécanique des fluides.
LAUGIER	Physiologie générale.
TOUSSAINT	Technique aéronautique.
HACKSPILL	Chimie (P. C. N.).

Secrétaire : A. PACAUD.

Secrétaire honoraire : D. TOMBECK.

SUR LES CONDITIONS DE CULTURE

ET LE

POUVOIR DE SYNTHÈSE DE *Saprolegnia* sp.

ÉTUDE QUALITATIVE

DE L'ALIMENTATION CARBONÉE, AZOTÉE ET SULFURÉE

Ce travail a été fait avec la souche isolée et étudiée par J. Chase (1925) et conservée depuis en culture pure au laboratoire de Botanique du P. C. N. Nous en devons la possession à l'obligeance de M. Guilliermond (1).

La nutrition de *Saprolegnia* a été étudiée avec du mycélium ensemencé en milieu liquide, dans des tubes de verre Pyrex de 15×150 millimètres, contenant 9 cent. cubes de solution nutritive. Les cultures, bactériologiquement pures, ont été conservées à l'abri de la lumière directe et à la température du laboratoire ; cette dernière oscillant quotidiennement entre 17°-18° le matin et 20°-22° le soir.

Comme il est malaisé d'effectuer de nombreux ensemencements à partir d'une même culture en milieu liquide (étant donné la résistance des filaments mycéliens), ce sont des milieux gélosés qui nous ont servi pour la conservation des souches. Ces milieux ont servi également lorsqu'il s'est agi de substituer un régime alimentaire donné à un autre, pour l'élimination des traces de l'ancien milieu et l'adaptation du champignon au niveau.

MILIEUX GÉLOSÉS. — Nous avons utilisé des milieux de même composition que les milieux liquides, additionnés d'une quan-

(1) La détermination exacte de cette souche ne peut être faite, étant donné qu'on n'en peut obtenir la reproduction sexuée (voir Chase, *loc. cit.*).

tité de gélose suffisante pour l'obtention d'un ensemble rigide (de 13 à 48 p. 1.000 suivant la composition et l'acidité du milieu). La gélose doit être préalablement lavée quarante-huit heures à l'eau courante, puis à l'eau bidistillée plusieurs fois renouvelée. Même avec ces précautions, la gélose contient des impuretés en quantité suffisante pour assurer une croissance de *Saprolegnia* — à vrai dire, très médiocre — en l'absence de corps sulfurés surajoutés. L'existence de ces impuretés dans le fragment de gélose, qui est introduit avec le mycélium au moment du premier repiquage en milieu liquide, se manifeste par une « croissance résiduelle » du champignon dans un milieu incomplet. Un deuxième repiquage dans le même milieu est alors impossible.

Les milieux gélosés présentant l'avantage d'assurer une survie très prolongée du mycélium : pratiquement, elle est limitée par la dessiccation du milieu. D'autre part « l'effet bios » ne se fait pas sentir en présence de gélose, chose importante lorsqu'il s'agit d'étudier la croissance de *Saprolegnia* dans des milieux simples, pauvres en substances organiques.

MILIEUX LIQUIDES. — La présence d'impuretés diverses dans la gélose oblige à recourir aux milieux liquides pour l'étude de la nutrition des *Saprolegnia*. Notons que la culture en milieu liquide permet de réaliser des conditions qui se rapprochent du mode de vie naturel des *Saprolegnia*, champion aquatique.

Les expériences de J. Chase montrent que *Saprolegnia sp.* présente une grande tolérance vis-à-vis des variations de pression osmotique du milieu. D'un autre côté, il possède un pouvoir de concentration élevé vis-à-vis des substances alimentaires (1). Tout ceci permet de faire varier la composition du liquide nutritif dans de larges limites.

Nous avons fixé la composition minérale de nos milieux à la formule suivante :

Eau bidistillée, en centimètres cubes . . .	1.000
PO ₄ HK ₃ , en gramme.	0,1
Cl ₂ Mg, en gramme	0,1
Cl ₆ Fe ₃	Traces.
NaOH	Q. S. pour pH = 7,0.

(1) Nous voulons dire par là qu'il est capable de se développer aux dépens de solutions très diluées de substances nutritives.

Lorsqu'il était nécessaire d'accroître le pouvoir tampon du milieu, sa composition était modifiée ainsi :

Eau bidistillée, en centimètres cubes . . .	1.000
Acétate de Na, en gramme	1,0
PO ₄ HK ₃ , en gramme	1,0
Cl ₂ Mg, en gramme.	0,1
Cl ₃ Fe.	Traces.
NaOH	Q. S. pour pH = 7,0.

Ces deux milieux nous ont servi au cours de toutes nos expériences.

MORPHOLOGIE DES CULTURES EN MILIEU LIQUIDE. — Si un petit fragment de gélose chargé de mycélium est déposé au fond d'un tube contenant une solution alimentaire, des filaments mycéliens se développent et montent vers la surface du liquide ; arrivés là, ces filaments se ramifient abondamment, au point de constituer un disque feutré très serré. La surface supérieure de ce disque mycélien est *effectivement émergée* : ainsi, une goutte d'eau déposée sur cette surface ne l'imprègne pas immédiatement, mais reste sphérique ; l'immersion du disque nécessite un certain effort, et, une fois immergé, il entraîne souvent une petite bulle d'air collée à sa surface.

Ayant atteint un certain développement, le premier disque mycélien plonge généralement et, au-dessus de lui, se développe alors un disque nouveau ; et ainsi de suite, jusqu'à épuisement du milieu nutritif. Dans une culture ainsi constituée, le dernier disque mycélien formé est seul vivant. Dans des milieux alimentaires défectueux, la formation de disques peut être enrayée et le mycélium arrivé à la surface se ramifie alors dans les limites du ménisque aqueux et grimpe le long du verre entraînant dans sa croissance une mince pellicule d'eau. Dans la partie centrale du tube, il se forme alors un enchevêtrement de filaments mycéliens immergés. Cette croissance en manchon (sans formation de disques mycéliens) indique le plus souvent une alimentation sulfurée défectueuse (qualitativement ou quantitativement).

L'épaisseur des filaments mycéliens varie quelque peu suivant la composition du milieu. Chase signale un amincissement des filaments en présence de fortes concentrations de

peptones. De notre côté, nous avons observé un amincissement toutes les fois que le milieu contenait des substances tant soit peu toxiques.

MESURE DE L'ACCROISSEMENT. — Comme son titre l'indique, le présent travail est essentiellement une étude d'ordre qualitatif : il ne contient ni données sur le rendement gravimétrique ou énergétique des cultures, ni mesures quantitatives de la consommation des aliments ; il ne contient pas, non plus, d'analyse chimique des produits de métabolisme. Nous avons étudié, par contre, les conditions de culture et la composition du milieu nécessaire au développement du champignon. Un premier résultat de ce travail sera donc de classer les substances chimiques (carbonées, azotées et sulfurées) en corps assimilables et non assimilables. Or, nous verrons par la suite que le pouvoir de synthèse de *Saprolegnia* vis-à-vis d'un élément donné (par exemple, de l'azote) n'a pas une valeur fixe, mais varie en fonction de la *qualité alimentaire* des autres éléments trophiques (par exemple, de celle du carbone ou du soufre). Il est donc indispensable de pouvoir se faire une idée de la valeur *qualitative* des corps étudiés. La qualité de l'aliment est donnée par la vitesse de la croissance du mycélium en sa présence. Pour l'évaluer, nous avons mesuré l'accroissement linéaire global du mycélium immergé. En effet, dans les milieux favorables, les filaments mycéliens s'allongent parallèlement et à chaque moment donné arrivent tous au même niveau. La hauteur de ce niveau, à partir de la base du tube, peut être mesurée à un demi-millimètre près. L'élévation du niveau mycélien en vingt-quatre heures à la température du laboratoire représente « l'accroissement journalier » dans les conditions données. En réalité le mycélium mort de la base du tube se tasse progressivement ; on s'en aperçoit lorsque la croissance du champignon s'arrête pour une raison ou pour une autre : le niveau supérieur du mycélium s'abaisse alors progressivement (de 2 millimètres en vingt-quatre heures environ) ; l'accroissement journalier, tel que nous venons de le définir, ne représente donc, en réalité, qu'un accroissement apparent. Cependant, dans un milieu invariable, cet accroissement est sensiblement constant d'un bout à l'autre de la montée du

mycélium. Réciproquement, toute variation dans l'accroissement journalier traduit, soit une variation intrinsèque (par exemple, une adaptation), soit une variation extrinsèque (épuiement de l'aliment, accumulation de produits de déchet). Cette méthode permet donc de suivre pas à pas toute l'évolution d'une culture.

Malheureusement, la valeur de l'accroissement journalier ne saurait constituer un critérium ni général, ni constant. D'abord, la densité du mycélium peut varier d'un milieu à l'autre. D'où la nécessité de ne comparer l'accroissement que dans des cultures de densité semblable. D'autre part, dans un grand nombre de milieux défectueux, le mycélium se développe généralement sous forme de filaments isolés, peu ramifiés et ne constituant pas de niveau supérieur net. Un phénomène analogue peut prendre place parfois dans les milieux riches : quelques filaments isolés parcourent rapidement la colonne liquide jusqu'en haut, et le mycélium se développe en surface ; ce « développement explosif » rappelle une véritable mutation, comparable dans une certaine mesure à la mutation pléomorphique des dermatophytes, étudiée par Sabouraud (1929), puis par Langeron et ses collaborateurs (1930). Cependant, la mutation « explosive » de *Saprolegnia* est parfaitement réversible, dans les limites d'une même souche et d'une même culture ; cette mutation paraît résulter du jeu de facteurs impondérables, dont la nature nous échappe à l'heure actuelle. Naturellement, les tubes présentant un développement « explosif » ne peuvent servir à la mesure de l'accroissement journalier. Enfin, les potentialités physiologiques d'une souche donnée ne sont pas immuables ; en dehors de tout phénomène d'adaptation, ces potentialités peuvent subir des fluctuations pour ainsi dire spontanées. L'accroissement journalier n'a donc de valeur que dans le cadre d'une même expérience, pour la comparaison entre le développement de cultures-sœurs (ensemencées à partir d'un même tube). Et cependant, malgré toutes ces restrictions, la méthode « altimétrique » rend de grands services, lorsqu'il s'agit de suivre l'évolution d'une même culture en fonction des changements du milieu, ou pour comparer le développement du champignon en présence d'une substance donnée avec le développement dans un milieu témoin. Nous verrons plus

loin le parti qu'on peut tirer de la mesure de l'accroissement journalier.

Notons que la croissance du mycélium de *Saprolegnia* sous l'eau ne suit pas une courbe logarithmique, mais une ligne droite, étant donné que cette croissance est uniquement terminale, les extrémités des filaments mycéliens étant seules vivantes.

Sur les graphiques joints à ce mémoire seront portées les hauteurs des mycéliums, mesurées de vingt-quatre heures en vingt-quatre heures et rapportées à un même point zéro, correspondant au niveau des cultures au moment du départ.

PASSAGE D'UN RÉGIME ALIMENTAIRE A UN AUTRE. — Pour passer d'un milieu de composition donnée à un autre milieu de composition différente, le mycélium est d'abord repiqué au moins trois fois de suite sur le nouveau milieu gélosé. A chaque fois un petit fragment de mycélium sur gélose, prélevé à la partie supérieure du tube, est ensemencé dans l'eau de condensation du tube suivant. Ces trois repiquages préliminaires, qui nécessitent environ un mois, assurent à la fois l'élimination de traces de l'ancien milieu nutritif et, généralement, une adaptation au nouveau régime suffisante pour que la nutrition du champignon puisse être étudiée en milieu liquide. L'adaptation en question se manifeste par un départ de plus en plus rapide et par un accroissement de plus en plus régulier des cultures sur gélose. Après ensemencement en milieu liquide, le départ des cultures n'est immédiat qu'en présence de peptones ou d'un mélange d'acides aminés; dans les milieux de composition plus simple, il existe toujours un certain temps de latence (jusqu'à trois jours), qui est en général d'autant plus prolongé — pour un régime donné — que la solution nutritive est plus concentrée, donc, dans certaines limites, plus cette solution se révèle favorable par la suite (1). Un autre effet assez général de la concentration du liquide alimentaire consiste en une régularisation de l'accroissement : plus le milieu est concentré, moins les écarts sont grands entre les hauteurs des mycéliums dans une même série de cultures (fig. 1 et 2).

(1) Cette sorte de freinage au départ est avant tout influencée par la concentration du milieu en électrolytes. La figure 2 nous offre un exemple typique de ce phénomène en fonction de la concentration en acétate d'ammonium.

Dans un liquide nutritif incomplet, les impuretés introduites avec le fragment de gélose permettent une certaine *croissance résiduelle* du mycélium. Le graphique de l'accroissement journalier sera représenté alors par une courbe caractéristique permettant de suivre l'épuisement de l'aliment déficient. Une fois cette croissance résiduelle arrêtée, l'addition de l'aliment manquant permettra la reprise du développement normal des cultures. *Ce double phénomène : arrêt du développement en l'absence d'un corps ; renouveau de développement après adjonction du même corps, indiquera que le corps envisagé est indispensable au développement du champignon.* Naturellement, des expériences de contrôle doivent indiquer que ce corps agit directement.

POUVOIR DE SYNTHÈSE MAXIMUM ET VARIATIONS DU POUVOIR DE SYNTHÈSE. — Nous avons dit que le pouvoir de synthèse de *Saprolegnia* vis-à-vis d'un élément donné (par exemple, du soufre) dépendait de la qualité trophique des autres corps présents dans le milieu (sources de carbone et d'azote). Nous appellerons « pouvoir de synthèse maximum » vis-à-vis d'un élément donné (par exemple, de l'azote) le pouvoir d'assimilation de cet élément dans les meilleures conditions réalisées en ce qui concerne l'assimilation des autres éléments étudiés (carbone et soufre). Si par suite du remplacement d'un composé chimique carboné, azoté ou sulfuré, dans les conditions d'assimilation optima, par un autre composé carboné, azoté ou sulfuré, la croissance s'arrête, mais une adjonction du corps remplacé fait repartir les cultures, nous dirons que, dans les conditions données, le corps remplaçant n'est pas assimilé ; si, au contraire, l'adjonction du corps remplacé ne suffit pas pour faire repartir les cultures, nous dirons que, dans les conditions données, le corps remplaçant est toxique.

Dans les chapitres suivants, nous envisagerons, d'une part, le pouvoir de synthèse maximum de *Saprolegnia*, d'autre part, les variations du pouvoir de synthèse en fonction des différentes substances trophiques. Dans ce but, nous ferons varier indépendamment les sources de carbone, d'azote et de soufre. Nous verrons que ce n'est pas toujours possible.

Disons tout d'abord que les peptones constituent un aliment organique complet. Chase cultivait sa souche dans des solu-

tions de peptone de 4 p. 100 à 5 p. 100 dans l'eau distillée. On peut obtenir des rendements semblables avec des solutions de peptone de 0,5 à 0,1 p. 100, en additionnant le milieu de substances minérales. Le degré d'hydrolyse des peptones n'a pas d'effet sur la facilité de leur assimilation : nous avons obtenu des accroissements journaliers semblables en présence de peptone Chapoteau, de « peptone pepsique de muscle de bœuf », de « peptone pancréatique très aminée » (Vaillant) ou d'« éreptone ».

LE FACTEUR ACIDITÉ. EVOLUTION DU pH DES CULTURES. — Le pH des milieux de culture a été mesuré par voie colorimétrique (indicateurs de Clark et Lubs). L'expérience montre que l'acidité d'une même culture en milieu liquide est différente à des hauteurs différentes. Pour mesurer le pH au niveau où s'effectue la croissance du mycélium, nous procédons de la façon suivante : une pipette effilée chargée d'une solution indicatrice est introduite jusqu'au fond du tube de culture, puis retirée doucement le long de la paroi, de façon à ce que le liquide indicateur s'en échappe progressivement ; il se forme ainsi une traînée verticale de liquide coloré ; quand la diffusion de ce liquide est suffisante, on obtient la gamme entière des valeurs de pH dans toute la hauteur de la colonne liquide. Naturellement, il faut maintenir le tube vertical pendant toutes ces opérations et éviter soigneusement toute cause pouvant provoquer la convection des différentes couches de la solution.

Les limites du pH de départ des cultures dépendent de la constitution du milieu : de nombreuses substances (par exemple, des sels minéraux) dont l'action ne se fait pas sentir au voisinage de la neutralité exercent un effet inhibiteur sur le développement à des valeurs de pH trop élevées ou trop basses. Dans les meilleures conditions que nous ayons pu réaliser (en milieux peptonés), les valeurs limites du pH de départ correspondent approximativement à 4,4 — 4,6 du côté acide et à 8,5 — 8,8 du côté alcalin.

En présence de sels (phosphates, acétates), nous avons observé une élévation de la limite inférieure à $pH = 5,5$ et un abaissement de limite supérieure à $pH = 8,0$. Etant donné que le champignon peut modifier dans une large mesure le pH du milieu,

l'évaluation du pH initial doit être effectuée au moment même du départ des cultures, au point précis où le mycélium se développe.

En présence de peptones comme seul aliment organique, le pH des cultures (quelle que soit sa valeur initiale) tend d'abord vers la neutralité; puis il s'élève, dans les cultures âgées, jusqu'à des valeurs de $pH = 7,6 - 7,8$. En présence d'un petit nombre d'acides aminés ou d'un amino-acide unique, l'élévation de pH est plus marquée et peut atteindre des valeurs de $8,2 - 8,4$. Dans ce dernier cas, l'élévation de pH varie en fonction du rapport C/N de l'acide aminé présent. L'adjonction d'une source de carbone supplémentaire (glycérine) permet au champignon de maintenir le milieu de culture à $pH = 6,9 - 7,1$. Par contre, il suffit d'ajouter au milieu une petite quantité d'un sucre fermentescible, pour que le pH tombe rapidement. Cette chute du pH est plus rapide en présence d'un acide aminé ou d'un sel ammoniacal qu'en présence de peptones. Tant que le milieu n'a pas atteint un pH de 5,5 environ, cette acidification n'a pas de répercussion sur l'accroissement du mycélium. Au delà de ce point, la croissance se ralentit progressivement. Si le pH atteint la valeur limite de $pH = 4,4 - 4,6$, l'accroissement devient nul; l'acidification s'arrête alors elle aussi. Si à ce moment on alcalinise légèrement le milieu, la culture repart et le pH redescend progressivement jusqu'à la valeur critique de $4,4 - 4,6$. L'expérience montre que l'arrêt du développement tient bien à la réaction du milieu et non point à l'épuisement d'une substance alimentaire indispensable. Mais il suffit que le mycélium atteigne dans sa croissance la surface du liquide, pour que les conditions soient tout aussitôt complètement modifiées : un disque mycélien se forme aussi rapidement que si le milieu était neutre; en même temps, le pH du milieu remonte. En déposant de toutes petites gouttes de solutions indicatrices à la surface du disque, on s'aperçoit qu'elle présente une réaction neutre ou alcaline (jusqu'à $pH = 8,0$). La physiologie du champignon est donc très différente suivant que le mycélium se développe sous l'eau ou en surface. Il est vraisemblable que l'acidification du milieu résulte d'une fragmentation fermentative des sucres fermentescibles par le mycélium immergé; le mycélium émergé consommerait les acides organiques précé-

demment formés. Cette hypothèse est corroborée par le fait que, dans les milieux exempts de sucres fermentescibles, on ne constate point cette sorte de différence de pH au niveau du disque émergé et dans le liquide sous-jacent (1).

En résumé, en présence d'un sucre fermentescible (et quelle que soit la source d'azote), le mycélium immergé n'est capable que d'une acidification du milieu; en présence d'acides aminés comme source unique de carbone et d'azote, il n'est capable que d'une alcalinisation; enfin, il est susceptible d'une équilibration bilatérale du pH en présence d'acides aminés et d'une source de carbone indépendante, non fermentescible (comme la glycérine), ou en présence de peptones.

NUTRITION CARBONÉE.

Les corps carbonés (glucides, acides organiques) ont été étudiés à des concentrations de 0,45 à 5 p. 1.000. Pour l'étude de l'acidification du milieu la teinture de tournesol a été utilisée dans les expériences préliminaires; les indicateurs de Clark dans les expériences plus précises.

Les différentes peptones de muscle constituent, nous l'avons dit, un aliment organique complet pour *Saprolegnia* sp. L'adjonction de glucides à un milieu peptoné à 1 — 10 p. 1.000 n'augmente pas visiblement l'accroissement journalier. Par contre, l'évolution du pH du milieu peut être profondément modifiée. Un petit nombre de glucides seulement sont fortement attaqués, avec production d'acides libres (+, glucides fermentés; —, glucides non fermentés) :

Polyols	Glycérine . .	—	Mannite . . .	—
Monosaccharides . .	Glucose . . .	+	Lévéulose . .	—
Disaccharides . . .	Maltose . . .	+	Saccharose . .	—
Polysaccharides . .	Dextrine . . .	+	Lactose	—

(1) On sait qu'un grand nombre de microorganismes cultivés en présence de glucides fermentescibles donnent lieu à une « alcalinisation secondaire » du milieu qui fait suite à l'acidification du début. Bach (1925) considère cette alcalinisation comme étant due à un dégagement d'ammoniaque, résultant de la nutrition de l'organisme aux dépens de sa propre substance après épuisement de l'aliment carboné. Une explication analogue s'appliquerait difficilement au cas de *Saprolegnia* étant donné que : 1° l'alcalinisation prend place immédiatement après la formation du premier disque mycélien, alors que le champignon est en pleine croissance : 2° elle se limite au voisinage immédiat

Nous voyons que seuls le glucose et ses polymères purs (maltose, dextrine) sont fermentescibles. Cependant, les autres glucides sont également consommés, ce qui apparaît nettement quand la peptone est remplacée par un amino-acide unique. C'est alors qu'apparaît aussi la qualité alimentaire inégale des différents glucides. Suivant la qualité alimentaire de l'acide aminé, on obtient alors un accroissement moyen ou bon en présence de glucides fermentescibles; un accroissement médiocre ou nul en présence de glucides non fermentescibles. Cependant, ces derniers sont consommés : si la source d'azote est représentée par un amino-acide favorable (alanine), l'accroissement journalier est plus élevé en présence d'un glucide non fermentescible qu'en son absence; d'autre part, en présence d'un glucide non fermentescible et d'un acide aminé le champignon acquiert le pouvoir de maintenir le milieu à $pH = 6,9 - 7,1$ (fig. 1).

En présence d'un amino-acide peu favorable (glycocolle), les sucres fermentescibles deviennent indispensables au développement (voir plus bas, p. 20).

L'acidification du milieu en présence d'un sucre fermentescible, causée par un déséquilibre dans la concentration totale du milieu en carbone et en azote; ainsi, l'adjonction de 0 gr. 45 de glucose par litre à un milieu contenant 1 gr. 35 d'alanine [ce qui a pour effet de créer un rapport de N total sur C total de 1 : 4 atomes environ] (1) suffit pour provoquer une acidification régulière du milieu; si, dans ces conditions, le pH atteint la valeur critique 4,4 à 4,6, la croissance s'arrête, sans que l'organisme puisse neutraliser l'acide formé en mettant en liberté l'ammoniaque de l'alanine. La marche de la culture est la même en présence d'une dose double de sucre et d'alanine.

Les acides organiques (acétique, lactique, pyruvique, succinique, tartrique, citrique), sous forme de sels de Na ou de NH_4 , constituent des aliments carbonés médiocres.

de ce disque; le fond du tube, chargé de mycélium mort, restant acide; 3° elle est indépendante (dans les limites étudiées) de la concentration du milieu en glucide et a lieu bien avant l'épuisement de l'aliment carboné.

(1) Ce rapport est donné par le nombre total d'atomes-grammes de l'azote contenu dans l'alanine et la cystéine du milieu, divisé par le nombre total d'atomes-grammes du carbone contenu dans le glucose, l'alanine et la cystéine.

Un mélange de plusieurs amino-acides appartenant à des séries différentes constitue une bonne source de carbone (accroissement journalier de 5 à 6 millimètres). Par contre,

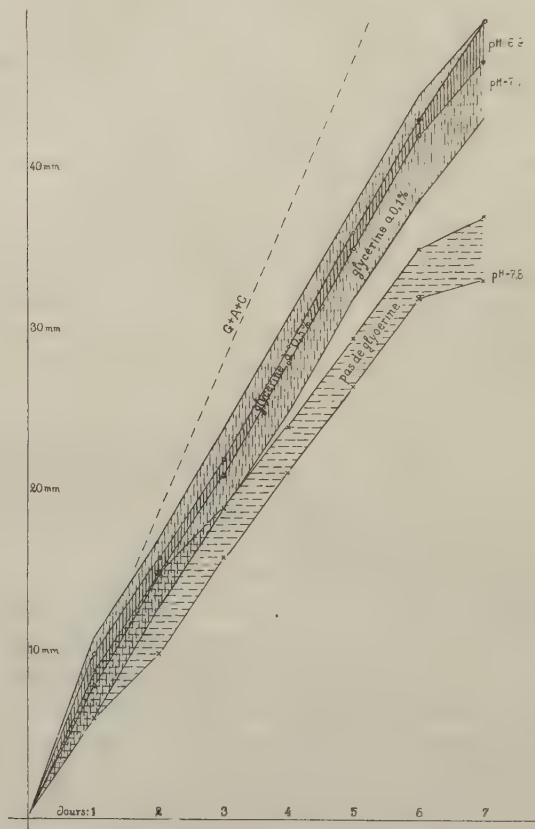


FIG. 1. — Croissance de *Saprolegnia* sp. en alanine + cystéine avec des doses variables de glycérine.

Dans chaque série de 6 cultures sont indiquées les valeurs maxima et minima des hauteurs du mycélium, et l'espace compris entre ces valeurs limites est hachuré. A la fin sont indiquées les valeurs de pH dans les trois milieux au septième jour (pH initial = 6,9).

Hachures horizontales : pas de glycérine ; hachures verticales discontinues : glycérine à 0,1 p. 100 ; hachures verticales continues : glycérine à 0,5 p. 100. C + A + C, valeur moyenne de la croissance du mycélium en présence de glucose + alanine + cystéine (accroissement journalier moyen de 9,36).

quelques-uns seulement des amino-acides pris isolément sont susceptibles d'assurer à eux seuls l'alimentation carbonée de

Saprolegnia : l'alanine, la cystéine, l'histidine, la phénylalanine donnent de bons résultats (accroissement journalier supérieur à 5 millimètres) ; l'asparagine donne des résultats médiocres ; le développement est fortement retardé en présence de glucosamine ; en présence de leucine, les résultats sont très mauvais ; enfin, le développement est nul en présence d'acide aspartique, de valine, de glycocolle ou de sarcosine.

NUTRITION AZOTÉE.

Pour comparer la qualité alimentaire de différents composés azotés, il faudrait se servir de solutions de ces corps à des concentrations telles que la quantité d'azote par litre soit toujours la même. Or, lorsqu'il s'agit de composés organiques, la même quantité d'azote correspond pour chaque corps donné à une quantité très différente de carbone assimilable, ce qui crée, pour des conditions d'assimilation azotée comparables, une alimentation carbonée très différente. On pourrait ramener la concentration totale en carbone aux mêmes taux en ajoutant des glucides, mais l'expérience montre que les conditions d'assimilation sont tout aussitôt modifiées. Pour comparer la qualité alimentaire des composés azotés organiques, il est donc nécessaire d'effectuer au moins deux séries d'expériences : dans l'une, c'est la concentration totale en N qui sera constante ; dans l'autre, la concentration globale des corps azotés étudiés. Heureusement, une concentration de 2 milli-atomes de N assimilable suffit pour assurer un développement normal et complet des cultures, et entre cette concentration et les concentrations toxiques (généralement beaucoup plus élevées) il existe un palier, dans les limites duquel l'accroissement journalier est sensiblement constant pour chaque corps donné et indépendant de la concentration de ce corps.

L'étude du pouvoir de synthèse maximum vis-à-vis de l'azote doit être faite, nous l'avons dit, dans des conditions optima d'alimentation carbonée et sulfurée. Ces conditions sont réalisées en présence d'un sucre fermentescible comme source de carbone et de cystine (ou de cystéine) comme source de soufre. Étant donné que la cystine contient elle-même de

l'azote, on est obligé de procéder par une méthode indirecte. Si, en présence d'une source supplémentaire d'azote assimilable, une dose de 0 gr. 05 de cystéine par litre de milieu assure un développement normal et complet des cultures, cette même quantité de cystéine ne contient qu'une quantité d'azote suffisante pour permettre au mycélium de s'élever à une hauteur de 3 à 4 cent. 5 au-dessus du fond du tube. Nous considérerons dans les conditions données comme assimilés tous les corps azotés qui assureront un développement complet des cultures en présence de 1 gramme de glucose et de 0 gr. 05 de cystéine par litre; comme non assimilés, dans les conditions données, tous les corps azotés dont la présence n'empêchera pas l'arrêt des cultures à une hauteur de 3 à 4 cent. 5 au-dessus du fond. Pratiquement nous opérons dans des conditions telles que l'azote de la cystéine constitue de $1/20$ à $1/40$ de l'azote total contenu dans le milieu.

Sur les graphiques, en portant le temps de culture en abscisses et la hauteur du mycélium en ordonnées, on obtient deux types de courbes (fig. 2) : si le corps étudié peut servir de source d'azote, on observe une montée régulière et continue de mycélium; autrement, la courbe atteint un maximum, puis redescend lentement, comme en présence de cystéine comme seule source d'azote. Étant donné qu'une acidification du milieu peut également provoquer une diminution progressive de l'accroissement journalier, il est nécessaire de vérifier dans ces derniers cas : 1° qu'une neutralisation du milieu ne suffit pas pour faire répartir les cultures; 2° que l'adjonction d'une quantité suffisante d'un corps azoté assimilable permet un développement normal.

Sont assimilés en présence de glucose et de cystine : les acides aminés : glycocolle, alanine, sérine, valine, leucine, cystine (ou cystéine), arginine, lysine, acide aspartique et asparagine, acide glutamique, glucosamine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane, proline, histidine; l'ammoniaque (sous forme de sels organiques); l'urée.

Ne sont pas assimilés dans les mêmes conditions : la sarcosine, l'acétamide, la triéthanolamine (acétate), l'acide nitrique (sel de K).

Nous donnerons à titre d'exemple les courbes d'accroisse-

ment linéaire du mycélium en présence de doses variables de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ (fig. 2).

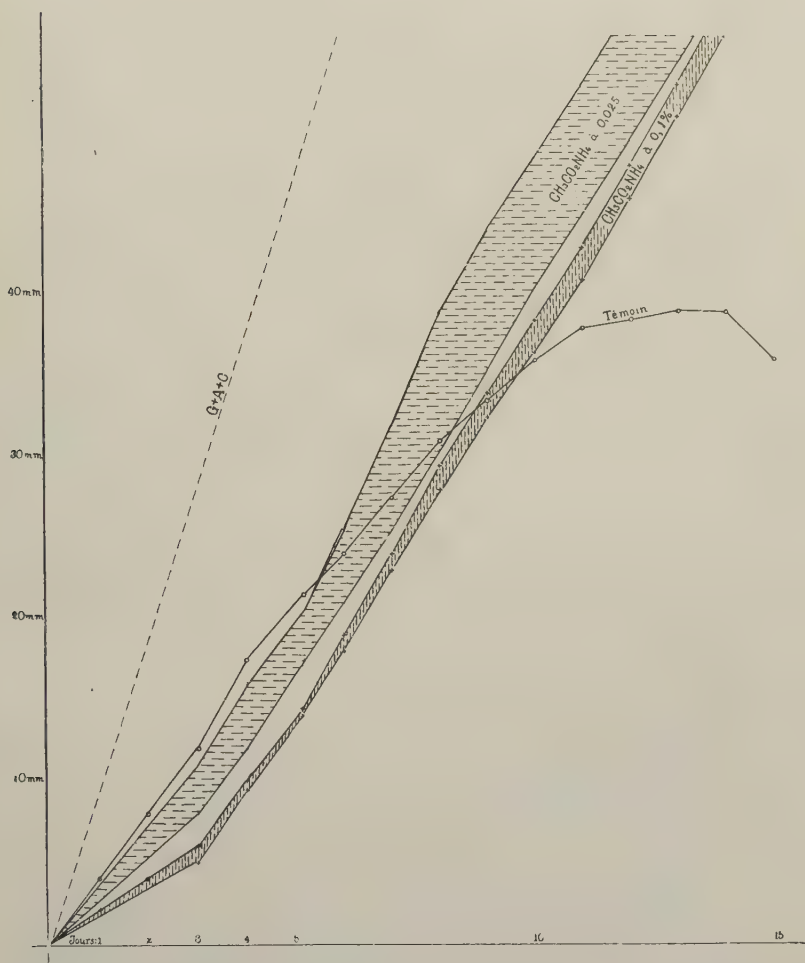


FIG. 2. — Croissance de *Saprolegnia* sp. en glucose + cystéine avec des doses variables d'acétate d'ammonium.

Dans chaque série de 6 cultures sont indiquées les valeurs maxima et minima des hauteurs du mycélium, et l'espace compris entre ces valeurs limites est hachuré. Afin de ne pas surcharger le tableau, n'ont été portées les hauteurs du mycélium que pour une seule culture témoin — sans acétate d'ammonium. Hachures horizontales : acétate d'ammonium à 0,025 p. 100; hachures verticales : acétate d'ammonium à 0,1 p. 100. G + A + C, valeur moyenne de la croissance du mycélium en présence de glucose + alanine + cystéine (accroissement journalier moyen de 9,36 mm.).

Si nous modifions les conditions de la nutrition carbonée ou sulfurée, le pouvoir de synthèse vis-à-vis de l'azote s'en ressent aussitôt. Ainsi, en présence d'un sucre non fermentescible, le glycocolle ne peut servir d'aliment azoté (voir plus loin, p. 20). De même, l'azote des sels ammoniacaux, organiques ne peut assurer la croissance du mycélium, si la cystine (comme source de soufre) est remplacée par H_2S . En somme, en l'absence de glucose ou de cystine, un nombre restreint d'acides aminés (alanine, phénylalanine, histidine, asparagine, etc.) peuvent seuls assurer l'alimentation azotée de *Saprolegnia*.

NUTRITION SULFURÉE.

Nous avons déjà consacré deux publications à l'énoncé de nos principaux résultats concernant l'étude du pouvoir de synthèse de *Saprolegnia* vis-à-vis du soufre. Rappelons brièvement ces résultats.

En présence de glucose et d'alanine, comme sources de carbone et d'azote, le champignon peut utiliser, comme source de soufre : la cystine (ou la cystéine), l'acide sulfhydrique, l'acide thioacétique, l'acide thiocarbonique, l'acide thiosulfurique (hyposulfureux); il n'utilise pas : l'acide sulfurique, l'acide sulfovinique.

La concentration minima des substances sulfurées permettant le développement du mycélium est indépendante de la concentration toxique de chacune de ces substances.

Concentration en milli-molécule . . .	0,25	0,75	1,5
Cystine (cystéine).	+++	+++	+++
H_2S	+	+++	—
CH_3COSH	++	—	—
$S_2O_3H_2$	+	+	+
CSO_3H_2	+	+	+
SO_4H_3	0	0	0
$SO_4HC_2H_5$	0	0	0

—, toxique; 0, non assimilé; +, assimilé, développement très lent, filaments mycéliens épars; ++, mycélium serré, accroissement journalier moyen de 5-6 millimètres; +++, mycélium serré, accroissement journalier de 8-10 millimètres.

Parmi les corps sulfurés, autres que la cystéine, c'est l'acide sulfhydrique (sous forme de sels alcalins) qui représente l'aliment de beaucoup le meilleur.

Notons que l'acide sulfurique ne peut servir de source de soufre ni en présence d'un mélange d'acides aminés, ni même en présence de polypeptides ; ainsi, dans un milieu à la peptone de soie (ne contenant que des traces de cystéine) et en présence de SO_4K_2 , le développement s'arrête, aussitôt épuisée la source de soufre organique. Ce résultat est valable aussi bien pour le mycélium immergé que pour le mycélium aérien. Ainsi, lorsque, dans un milieu à la peptone de soie et au sulfate de K, la quantité de soufre organique est suffisante pour permettre au mycélium de monter à la surface du liquide et de former un premier disque émergé, la croissance s'arrête tout de même et la formation des disques suivants est enrayée.

Dans les limites des concentrations étudiées, la présence de SO_4K_2 a pour seul effet d'entraver la « croissance résiduelle » du mycélium :

« Croissance résiduelle » de *Saprolegnia* sp. en glucose + aniline, sans cystéine et en présence de doses croissantes de SO_4K_2 (premier repiquage en milieu liquide à partir du même milieu gélosé) :

SO ₄ K ₂ en milli-molécules	AGE DES CULTURES		
	2 jours	4 jours	9 jours
	—	—	—
0,0	±	++	+++±
0,2	±	++	+++±
0,5	0	±	+±
1,0	0	0	+
2,5	0	0	±

Notons enfin que le remplacement de la cystine par d'autres corps sulfurés (comme SH_2) n'est compatible avec le développement qu'en présence d'un sucre fermentescible (comme le glucose) et d'une source d'azote favorable (comme l'alanine). En présence d'autres sources de carbone et d'azote, la cystine (ou la cystéine) constitue la seule forme de soufre assimilable.

CORRÉLATIONS ENTRE LE POUVOIR DE SYNTHÈSE DE *Saprolegnia* sp.
VIS-A-VIS DES TROIS ÉLÉMENTS ÉTUDIÉS (C, N, S).

La présence d'un sucre fermentescible, superflue dans un milieu peptoné à 1 ou 5 p. 1.000, devient favorable au développement en présence de peptone à 0,5 p. 1.000, ou si l'azote est fourni sous forme de cystéine ou d'alanine: elle devient indispensable si l'azote est fourni sous forme de glycocolle.

Croissance de *Saprolegnia* sp. en présence de glucides à 3 p. 1.000 et de glycocolle à 1 p. 1.000, ou de peptone à 0,5 p. 1.000; tous les tubes contiennent de la cystine à la dose de 0,03 p. 1.000. O, pas de développement; +, cultures très pauvres, filaments mycéliens épars; ++, cultures normales.

	GLYCOCOLLE	PEPTONE
	—	—
Pas de glucides	0	+
Glycérine	0	+
Mannite.	0	+
Glucose.	+	++
Lévulose.	0	+
Galactose	0	+
Maltose.	+	++
Saccharose.	0	+
Lactose	0	+
Dextrine	+	++

La croissance est donc semblable dans un milieu contenant de la peptone et un sucre non fermentescible (lévulose) et dans un milieu contenant un sucre fermentescible (glucose) et du glycocolle.

La cystine, qui peut être remplacée par une série de corps sulfurés en présence de glucose et d'alanine, devient la source de soufre obligatoire en l'absence de glucose, ou si l'alanine est remplacée par un sel ammoniacal.

Le pouvoir de synthèse du champignon vis-à-vis d'un élément donné dépend donc de la qualité alimentaire des autres éléments présents.

On peut classer les différents composés carbonés, azotés et sulfurés en trois grands groupes suivant leur qualité alimen-

taire pour *Saprolegnia*. Dans chacun de ces groupes, nous n'indiquerons que les principaux représentants :

ASSIMILÉS		NON ASSIMILÉS
Aliments favorables	Aliments médiocres	
<i>Carbone :</i>		
Glucose.	Lévilose, saccharose,	CO ₂
Maltose.	Galactose, lactose,	
Dextrine.	Glycérine, mannite,	
Peptones.	Aminoacides,	
	Acides ternaires.	
<i>Azote :</i>		
Alanine, sérine,	Glycocolle.	NO ₃ H
Phénylalanine.	Urée.	
Cystine (cystéine).	Ammoniaque.	
<i>Soufre :</i>		
Cystine (cystéine).	Acide sulfhydrique.	SO ₄ H ₂
	Acide thioacétique.	
	Acide thiocarbonique.	
	Acide thiosulfurique.	

Il est évident que si l'un des trois éléments en question est représenté dans le milieu par un composé non assimilable, le développement du mycélium ne pourra avoir lieu. Mais pour que le développement prenne place, il faut, de plus, que le milieu possède une certaine valeur trophique globale définie par la qualité alimentaire de chacun de ses constituants. Si nous désignons les bons aliments carboné, azoté et sulfuré par des majuscules (C, N, S), les mauvais par des minuscules (*c*, *n*, *s*), si nous indiquons un bon développement par ++, un mauvais par + et un développement nul par 0, nous pourrions résumer nos observations dans le tableau suivant :

CNS . . .	++	CN _s	+	CnS	+	Cns	0
cNS	+	cNs	0	cnS	0	cns	0

Autrement dit, pour que le développement ait lieu, il faut que deux, au moins, des aliments soient bons.

Naturellement, le schéma ci-dessus est — comme tous les schémas — imparfait : la qualité alimentaire des différents corps réunis dans un même groupe n'est pas identique, et tous les intermédiaires existent entre les composés classés comme « favorables » et comme « aliments médiocres ». Il n'en persiste pas moins cette conclusion générale que le pouvoir de synthèse d'un organisme vis-à-vis d'un élément donné dépend de la qualité trophique des autres éléments nutritifs présents et que l'assimilation d'un composé donné doit être nécessairement étudiée en fonction de l'assimilation des autres corps.

Cette conclusion est en accord avec un certain nombre de données concernant les bactéries. Ainsi, l'on sait que l'assimilation des nitrates par certains microorganismes nécessite la présence de glucides fermentescibles. Dans le présent chapitre, nous avons profité de nos données nouvelles concernant les variations du pouvoir de synthèse de *Saprolegnia* pour présenter cette notion sous forme concise et explicite.

DISCUSSION DES RÉSULTATS.

A la suite d'une étude uniquement qualitative, ne comportant ni dosage des produits consommés, ni mesure du rendement énergétique des cultures, ce serait outrepasser la portée de nos résultats que de nous lancer dans une discussion de nos observations au point de vue chimique. Nous profiterons des faits établis par d'autres pour tenter de coordonner et d'expliquer certaines de nos données.

Le pouvoir de synthèse de *Saprolegnia* en cultures immergées ne saurait être comparé sans réserve à celui des champignons à spores aériennes et qui se développent à la surface des liquides nutritifs. Les conditions d'oxygénation sont, en effet, différentes à la surface du liquide ou en profondeur. Nous avons vu que, dans les cultures immergées et en présence de glucose, le développement du champignon était accompagné d'une acidification rapide du milieu qui pouvait s'expliquer par une formation d'acides organiques aux dépens du sucre. C'est là un caractère d'anaérobiose partielle, qui disparaît aussitôt le mycé-

lium arrivé à la surface du liquide. C'est une notion classique datant de Pasteur.

L'électisme du champignon vis-à-vis de l'aliment glucidique est vraisemblablement lié lui aussi au mode de croissance immergé de *Saprolegnia*. On sait que les moisissures se développent avec des vitesses semblables aux dépens de sucres divers lorsqu'elles sont ensemencées en surface (Terroine et Wurmser, 1922 ; Coupin, 1927 *a*). Par contre, le développement est moins rapide en présence de polyalcools (Czapek, 1902) ; la qualité alimentaire de ces derniers serait déterminée par la facilité avec laquelle ils pourraient être transformés en glucose (Kostytschew, 1926). Une différence notable entre la qualité trophique des différents sucres apparaît aussitôt que les conditions d'oxygénation des cellules sont modifiées (déjà dans les graines en voie de germination : Terroine, Trautmann, Bonnet et Jacquot, 1925) ou lorsque le milieu nutritif est défectueux (Molliard, 1918).

Une deuxième particularité physiologique de *Saprolegnia* réside dans la valeur relativement élevée du pH limite inférieure compatible avec son développement ($pH = 4,4 - 4,6$). On sait que la grande majorité des moisissures étudiées peuvent se développer dans des milieux beaucoup plus acides : jusqu'à $pH = 1,2$, dans le cas de *Sterigmatocystis nigra* (Terroine et Wurmser) ; jusqu'à 2,6 dans celui de *Aspergillus repens* (Bach, 1925).

Robbins (1924) montre, par l'application de méthodes indirectes, que le point isoélectrique de *Rhizopus nigricans* correspond à $pH = 5,0$ et celui de *Fusarium lycoperdici* à $pH = 5,5$: sur milieu solide, le développement de ces espèces peut avoir lieu aussi bien au-dessus qu'au-dessous du pH isoélectrique, mais qu'à ce dernier correspond une vitesse d'accroissement minimum. La transpiration peut être envisagée comme un facteur de la circulation d'eau (et des aliments dissous entraînés) dans le cas d'un mycélium aérien ; ce facteur ne peut intervenir dans le cas d'un mycélium immergé. Si nous observons que l'entrée de l'eau dans les plantes aquatiques (submergées) semble due en grande partie à une osmose électrique (Keller, 1932), et que cette osmose nécessite l'existence d'une charge électrique négative au niveau de la paroi absorbante, il

est permis de supposer que la valeur critique de $pH = 4,4 - 4,6$ correspond au point isoélectrique du mycélium de *Saprolegnia* (1).

Parmi les différents Phychomycètes étudiés (Bach, 1927), *Saprolegnia* se rapproche, au point de vue de son alimentation azotée, des *Rhizopus* et s'oppose aux *Mucors* (non-assimilation des nitrates). Par sa préférence pour certains aminoacides (comparativement aux sels ammoniacaux), *Saprolegnia* se distingue de la majorité des moisissures. Bach (*loc. cit.*) montre (*contra* Czapek, 1901) que, dans le cas d'*Aspergillus repens*, les sels ammoniacaux constituent une source d'azote meilleure que les acides aminés : l'assimilation de ces derniers comporterait le travail supplémentaire de la désamination. L'utilisation de l'ammoniac est un phénomène très général, puisque les vertébrés eux-mêmes peuvent assimiler, à côté d'un taux d'azote « différencié », une certaine proportion d'azote ammoniacal (Terroine, Fleuret et Stricker, 1923). Par contre, on connaît un certain nombre d'organismes capables d'assimiler l'azote d'un aminoacide, incapables d'assimiler l'azote ammoniacal : *Hæmatococcus pluvialis*, *Chlamydomona agloëformis*, à l'obscurité (A. Lwoff, 1933) ; *Euglena deses*, à la lumière (H. Dusi, 1932). On pourrait se demander si l'énergie dégagée par la désamination exothermique des acides aminés n'était pas utilisée dans ces cas pour la réalisation des synthèses ultérieures. Cependant, Terroine et Bonnet (1926), Terroine, Trautmann, Bonnet et Jacquot (1925) montrent que l'énergie de désamination est perdue pour l'organisme. Il semble donc que de simples considérations de thermodynamique ne permettent pas de prédire la valeur trophique des différents corps azotés pour un organisme donné : si certains organismes (tels qu'*Aspergillus*) présentent une grande tolérance vis-à-vis de l'aliment azoté, « une dégradation physiologique » (2) plus poussée conduit à une spécificité plus grande des sources

(1) L'absorption de l'eau par les moisissures se développant à la surface de liquides fortement acides irait alors à l'encontre du « facteur électrostatique ». Winslow, Falk et Caulfield (1923) trouvent, en effet, par voie électrophorétique, qu'une moisissure, viable à des pH très bas, est chargée positivement, en quoi elle s'oppose à la majorité des organismes étudiés à ce point de vue.

(2) Au sens de A. Lwoff (1932).

d'azote assimilable. C'est peut-être dans une réduction de l'arsenal diastasique de ces organismes qu'il faudrait avec Schœn, (1931) chercher une explication de la spécificité en question.

Au point de vue de son alimentation azotée, *Saprolegnia*, nous l'avons dit, présente une tolérance assez grande, si l'on opère dans des conditions où son pouvoir de synthèse est maximum. Il serait à comparer en cela à certaines bactéries, comme le bacille d'Eberth, qui n'assimile l'azote du glycolle qu'en présence d'un aliment énergétique approprié.

La clef de la culture de *Saprolegnia* en milieu synthétique était donnée, nous l'avons dit, par l'alimentation sulfurée de cet organisme : un trait caractéristique de sa physiologie consiste dans son inaptitude à réduire les sulfates. Ce caractère semble jouer un rôle décisif dans la répartition de *Saprolegnia*, champignon aquatique qui ne se développe que sur des animaux morts ou vivants (en présence de cystéine) ou sur des matières organiques immergées en putréfaction à l'abri de l'air (en présence d' H_2S).

Ainsi que l'indique la « loi des minima » de Liebig, les différents éléments chimiques entrant dans la constitution d'un organisme ne peuvent se remplacer l'un l'autre ; il suffit donc que l'un de ces éléments fasse défaut ou soit présenté sous une forme inassimilable pour que le développement de l'organisme soit rendu impossible. Mais, pour que le développement dans un milieu complet puisse avoir lieu, il faut, en outre, que l'énergie totale fournie par les sources énergétiques présentes dans le milieu soit suffisante pour permettre la réalisation de l'ensemble du travail synthétique effectué par l'organisme. Ces considérations pourraient expliquer ce fait qu'en présence d'une même source énergétique (comme le glucose), le pouvoir de synthèse de *Saprolegnia* vis-à-vis d'un élément (comme le soufre) varie en fonction de la qualité alimentaire des autres éléments (comme par exemple, l'azote) ; inversement, en présence d'une source de soufre donnée (cystine), le pouvoir de synthèse vis-à-vis de l'azote variera en fonction de la qualité de l'aliment énergétique (glucide).

On admet à l'heure actuelle qu'entre la consommation du glucose et de son isomère cétonique (lévulose), il ne peut y avoir de différence de principe, mais uniquement une différence

de vitesse : si l'un des sucres est consommé, l'autre, l'est aussi ; l'énergie fournie par la combustion d'une molécule de chacun est sensiblement la même (Emery et Benedict). D'après Lindet (1911) et Molliard (1918), le lévulose ne sert qu'à l'édification de cellules dans des cas où le glucose peut constituer en plus une source d'énergie importante. A la suite de Duclaux, Terroine et Wurmser montrent que l'énergie consommée par un organisme se décompose en une « énergie de croissance » et une « énergie d'entretien ». Il en résulte que la croissance de l'organisme nécessite l'absorption, par unité de temps, d'énergie supérieure à celle qui est utilisée pour son entretien dans les conditions données. S'il en est ainsi, une différence quantitative (vitesse d'oxydation) entre deux isomères peut conduire, dans des conditions déterminées (glycolle, comme source d'azote, cystine, comme source de soufre), à une différence de principe : développement en présence de glucose ; absence de développement en présence de lévulose. Cette explication est d'autant plus plausible que des disaccharides non fermentescibles contenant du glucose (comme le saccharose ou le lactose), et qui sont consommés, donnent les mêmes résultats que le lévulose : à ce point de vue, la présence d'une molécule de glucose libre n'équivaut pas à la présence d'une molécule de saccharose ou de lactose.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES.

Si nous nous figurons les organismes hétérotrophes comme descendant d'ancêtres chlorophylliens hypothétiques, nous pourrions distinguer deux grandes voies suivant lesquelles se déroule cette « dégradation physiologique », autrement dit, la réduction progressive du pouvoir de synthèse :

D'une part, les organismes « spécialistes » (pour employer une expression de Kostytschew), chez lesquels la perte de fonctions est unilatérale, et dont le développement n'a lieu qu'en présence d'un certain nombre de substances bien définies ; un bel exemple dans cette série est donné par les « oxytrophes » de Lwoff (1932), organismes qui ne peuvent effectuer leur nutrition carbonée qu'aux dépens d'acides gras inférieurs à chaîne linéaire contenant de préférence un nombre pair de

groupement CH_2 . L'oxytrophie coïncide, dans tous les cas étudiés, avec la persistance de leucoplastes, et il y a lieu de croire, avec Lwoff, que cette relation traduit plus qu'une simple coïncidence.

D'autre part, les organismes « non spécialistes », où la source d'azote organique peut servir en même temps de source de carbone (« haplotrophes » de Lwoff).

Parmi tous les éléments chimiques entrant dans la constitution des êtres vivants, trois corps ne sont assimilés à partir de leurs oxydes qu'à la suite d'une réduction ; ce sont : le carbone, l'azote et le soufre. La dégradation des organismes « non spécialistes » porte, en particulier, sur le pouvoir de réduction de ces trois éléments : une première étape de cette lignée est constituée par des moisissures comme *Aspergillus*, capables de réduire les nitrates et les sulfates et ne se distinguant, somme toute, des végétaux autotrophes que par l'absence de chlorophylle et de plastes : le carbone seul ne peut être assimilé à partir de son oxyde ultime. L'étape suivante est représentée par la majorité des levures, où à l'impossibilité d'assimiler le carbone à partir de CO_2 s'ajoute l'inaptitude à réduire les nitrates.

Ensuite vient une lacune dans la série physiologique, étant donné que la perte du pouvoir de réduction vis-à-vis du troisième élément (soufre), — si tant est qu'elle existe — est masquée — dans les organismes jusqu'ici étudiés — par une dégradation plus profonde de l'assimilation azotée (« haplométatrophie » de Lwoff). Nous trouvons, cependant, une indication favorable à l'idée de cette chute du pouvoir de synthèse vis-à-vis du soufre dans ce fait, démontré par Abderhalden, que la cystine fait partie des aminoacides alimentaires indispensables pour les Vertébrés. Le cas de *Saprolegnia* comble cette lacune en fournissant l'exemple d'un organisme « haplomésotrophe » où la réduction du pouvoir de synthèse porte à la fois sur les trois éléments chimiques nécessitant une réduction : C, N et S. La nutrition sulfurée aux dépens de H_2S est, à ce point de vue, comparable à la nutrition aux dépens de NH_3 , et la nutrition aux dépens de combinaisons organiques du soufre, à celle aux dépens d'azote organique.

Dans sa classification physiologique des microorganismes, A. Lwoff (*loc. cit.*) se base sur les caractères de la nutrition carbonée et azotée et sur la nature de la source d'énergie utilisée par les organismes.

Ces caractères permettent de définir, d'une part : 1, les « prototrophes » (assimilation de l'azote atmosphérique ; 2, les « autotrophes » (aliments azoté et carboné minéraux) ; 3, les « mésotrophes » (synthèse des protides à partir de NH_3 ; aliment azoté : nitrate, sel d'ammonium ou acide aminé ; un composé organique est indispensable) ; 4, les « métatrophes » (un aliment azoté complexe — peptone — est indispensable). D'autre part : 1, les « chimiotrophes » (assimilation de CO_2 grâce à l'oxydation de composés organiques) ; 2, les « phototrophes » (assimilation de CO_2 grâce à la photosynthèse) ; 3, les « oxytrophes » (un composé carboné organique indépendant est indispensable quel que soit l'aliment azoté) ; 4, les haplotrophes » (l'aliment azoté organique peut servir de source carbonée).

La superposition de ces deux séries de caractères permet à Lwoff de définir, par exemple, des organismes « chimioautotrophes », « oxymésotrophes », « haplomésotrophes ».

**Subdivisions du groupe des mésotrophes
dans la classification physiologique des microorganismes
de A. Lwoff.**

PHOTOTROPHES	OXYTROPHES	HAPLOTROPHES
<i>Mésotrophes N — S (non-assimilation de NO_3H et de SO_4H_2) :</i>		
		Haplomésotrophes N — S (<i>Saprolegnia sp.</i>).
<i>Mésotrophes — N (non-assimilation de NO_3H) :</i>		
Photomésotrophes N (<i>Euglena anabaena</i>).	Oxymésotrophes N (<i>Polytoma uvella</i>).	Haplomésotrophes N (<i>Saccharomyces</i> , etc.).
<i>Mésotrophes sensu stricto (assimilation de NO_3H et de SO_4H_2) :</i>		
		Haplomésotrophes s.s. (<i>Aspergillus</i> , <i>Sterigmatocystis</i>).

En tenant compte des potentialités physiologiques des organismes mésotrophes dans les conditions de pouvoir de synthèse maximum, nous pourrions subdiviser ces organismes en trois séries : les *mésotrophes sensu stricto* (assimilation des nitrates et des sulfates) ; les *mésotrophes N* (non-assimilation des nitrates, assimilation des sulfates) ; les *mésotrophes N—S* (ni les nitrates, ni les sulfates ne sont assimilés). *Saprolegnia sp.* serait

alors un mésotrophe N—S. On pourrait envisager aussi l'existence de mésotrophes S (assimilation de sulfates, non assimilation de nitrates), mais ce groupe ne trouverait à l'heure actuelle aucun exemple connu.

Les subdivisions ci-dessus peuvent être résumées dans le tableau de la page précédente.

Nous croyons que, dans l'avenir, la liste des organismes rentrant dans la série N—S pourra être allongée aux dépens d'organismes actuellement considérés comme métatrophes. Alors le cas de *Saprolegnia* n'apparaîtra plus aussi isolé.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1923. BACH (Denis). Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* de Bary. Influence de la réaction du milieu. Ed. : A. Brulliard, Saint-Dizier.
1927. BACH. La nutrition azotée des Mucorinées. Assimilation de l'ion nitrique. *C. R. Ac. Sc.*, **184**, p. 178.
1923. CHASE (Jean). Essais de culture pure d'une *Saprolegniacée* (Diplôme d'Études Supérieures), éd. L. Declume, Lons-le-Saulnier.
1927. COUPIN (Henri). Sur la nutrition carbonée du *Penicillium glaucum* à l'aide de divers composés de la série grasse. *C. R. Ac. Sc.*, **184**, p. 1575.
1933. DUSI (H.). Recherches sur la nutrition de quelques Euglènes. *Annales de l'Institut Pasteur* (à l'impression).
1926. KOSTYSCHEW (S.). Lehrbuch der Pflanzenphysiologie (I). J. Springer, Berlin.
1930. LANGERON (M.) et MILOCHEVITCH (S.). Morphologie des Dermatophytes sur milieux naturels et milieux à base de polysaccharides. Essai de classification. *Ann. de Parasitol.*, t. VIII, pp. 422 et 465.
1911. LINDET (L.). Sur le pouvoir électif des cellules végétales vis-à-vis du dextrose et du lévulose. *C. R. Ac. Sc.*, **152**, p. 775 et *Ann. Inst. nat. Agron.* (2), **10**.
1932. LWOFF (André), Recherches biochimiques sur la nutrition des Protozoaires. *Monogr. de l'Inst. Pasteur*, éd. Masson, Paris.
1918. MOLLARD (Marin). Influence de certaines conditions sur la consommation comparée du glucose et du lévulase par *Sterigmatocystis nigra* à partir du saccharose. *C. R. Ac. Sc.*, **167**, p. 1043.
1924. ROBBINS (William J.). Isoelectric points for the mycelium of fungi. *J. gen. Physiol.*, **6**, p. 259.
1929. SABOURAUD (R.). Généralités concernant les Dermatophytes (IV^o). Le problème du pléomorphisme des cultures des Dermatophytes. *Ann. de Dermatol. et Syphil.* (6), **10**, p. 481.
1931. SCHÖEN (M.). Problèmes de spécificité dans les processus de fermentation. *Annales de l'Institut Pasteur*, **47**, p. 690.
1926. TERMOINE (Emile-F.) et BONNET (R.). Le mécanisme de l'action dynamique spécifique. *Ann. Physiol. et Physicochim. Biol.*, n^o 4, p. 483.

1923. TERROINE (Emile-F.), FLEURET (P.) et STRICKER (Th.), L'aptitude comparée des protéiques déficientes et des sels ammoniacaux organiques à la couverture partielle du besoin minimum d'azote. *Arch. intern. Physiol.*, **12**, p. 43.
1925. TERROINE et TRAUTMANN (M^{lle} S.), BONNET (R.) et JACQUOT (R.), L'énergie de croissance (III^e). Rendements énergétiques comparés dans le développement de moisissures sur divers aliments organiques, et mécanisme de l'action dynamique spécifique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **7**, p. 351-(IV^e). Le rendement énergétique des divers glucides dans la croissance des végétaux supérieurs. *Ibid.*, p. 461.
1922. TERROINE et WURMSER (R.), L'énergie de croissance (I^{er}). Le développement de l'*Aspergillus niger*. *Ibid.*, **4**, 519.
1932. VOLKONSKY (M.), Culture de *Saprolegnia* sp. en milieu synthétique. Son alimentation sulfurée. *C. R. Soc. Biol.*, **109**, p. 528. Utilisation de différentes combinaisons du soufre par *Saprolegnia* sp. *Ibid.*, p. 614.
1923. WINSLOW (C. F. A.), FALK (J. S.) et CAULFIELD (M. F.), Electrophoresis of bacteria as influenced by Hydrogen ion concentration and the presence of Sodium and Calcium salts. *J. gen. Physiol.*, **6**, p. 177.
-

PREMIÈRE THÈSE

Digestion intracellulaire et accumulation des colorants acides.
Étude cytologique des cellules sanguines des Sipunculidés.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 27 janvier 1933.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Ch. MAURAIN

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY

